

**(12) Publication of Patent Application (A)**

**(11) Publication Number of Patent Application: JP-A-58-98085**

## **Specification**

### **Title of the Invention**

#### **HIGH YIELD CULTURE METHOD FOR MICROORGANISMS**

### **Claims**

1. A high yield culture method for microorganisms metabolizing an acidic or alkaline substance as the microorganisms proliferate under environmental conditions controlled to be preferable for the proliferation of the microorganisms, characterized by measuring the amount of addition of a pH regulating agent and controlling substrate supply rate based on said amount of addition.

2. A high yield culture method for microorganisms according to claim 1, wherein a predetermined set amount of said pH regulating agent is added in succession, and the total amount is calculated by multiplying the number of additions, obtained by multiplying the frequency of such additions by the set period, with the predetermined set amount of one addition.

### **Detailed Description of the Invention**

The present invention relates to a high yield culture method of microorganisms, and more particularly to a high yield culture method adapted for a high yield culture of microorganisms metabolizing an acidic or alkaline substance with proliferation.

As a culture method for microorganisms, there is already known a method of supplying the entire amount of a substrate constituting a carbon source prior to the start of culture, or a method of supplying a substrate constituting a carbon source also in the course of culture.

However, the former culture method for microorganisms has a drawback in that the proliferation of the microorganisms is hindered by the large amount of carbon source present at the start of the culture, while the latter culture method for microorganisms is capable of maintaining a stable culture over a long period as the concentration of the carbon source can be maintained constant, but, because the consumption rate of the carbon source by the microorganisms shows a large variation, it is associated with following drawbacks, depending on the supply method of the substrate constituting the carbon source:

(1) In a method of supplying a predetermined constant amount of substrate in succession or in continuous manner, in case the supply amount of the substrate cannot follow the change in the consumption rate of the carbon source by the microorganisms, the carbon source becomes excessive or deficient to hinder the proliferation of the microorganisms;

(2) In case the carbon source is an organic acid, there can be employed a method of supplying the substrate constituting the carbon source utilizing pH of the culture medium as an index, but, in such case, it is unavoidable that pH of the culture medium increases with the consumption of the organic acid by the microorganisms, and the carbon source is restricted;

(3) In case the carbon source is neutral, there can be employed a method of supplying the substrate constituting the carbon source utilizing a dissolved

oxygen concentration as an index, but a current dissolved oxygen concentration meter has difficulties in that it has drift, sensitivity loss etc. and is incapable of providing an exact dissolved oxygen concentration, whereby the substrate supply cannot be precisely controlled.

The present invention has been devised to solve the aforementioned drawbacks, and is devised to provide a high yield culture method for microorganisms capable of attaining a high yield of microorganisms, characterized in measuring an amount of addition of a pH regulating agent and controlling a supply rate of a substrate constituting a carbon source based on such amount of addition.

An embodiment of the present invention will be explained with reference to the accompanying drawing.

The drawing is a system view of a high yield culture apparatus for microorganisms embodying the present invention, wherein a culture tank 10 is provided with a dissolved oxygen concentration regulating apparatus, for example rotatable agitating fins 12 rotated by a drive apparatus 11 having a revolution rate varying apparatus, a pH regulating apparatus 13 having an alkali or acid tank with a solenoid valve and a regulating valve all on top of the apparatus, a substrate supply rate regulating apparatus such as a variable flow rate pump 14, a pressure regulating apparatus such as an exhaust flow rate regulating valve 15, or a pressure measuring apparatus such as a pressure gauge 16, while in a middle portion there are provided a pH measuring apparatus such as a pH electrode 17, a temperature measuring apparatus such as a temperature-measuring resistor 18, and a dissolved oxygen concentration measuring apparatus such as a dissolved oxygen concentration meter 19, and an

aerating pipe 20 is connected to a lower part. Also, a jacket 21 provided around the culture tank 10 is provided with a temperature regulating apparatus such as coolant flow rate regulating valve 22. The pressure gauge 16, the pH electrode 17, the temperature-measuring resistor 18 and the dissolved oxygen concentration meter 19 are respectively connected to an analog/digital converting apparatus such as an A/D converter 23 with a multiplexer and capable of multi-point processing, while the drive apparatus 11, the pH regulating apparatus 13, the variable flow rate pump 14, the exhaust flow rate regulating valve 15 and the coolant flow rate regulating valve 22 are respectively connected to a calculation/control/memory/input-output apparatus such as a minicomputer 24 with a keyboard, that is connected to the A/D converter 23.

A culture medium 25 is charged in the culture tank 10 and, in case the microorganisms are for example aerobic, the culture is started by aeration from the aerating pipe 20. During the culture, pH, temperature, and dissolved oxygen concentration of the culture medium 25 and pressure of the culture tank 10 are measured by the pH electrode 17, the temperature-measuring resistor 18, the dissolved oxygen concentration meter 19 and the pressure gauge 16, and these measured values are respectively converted by the A/D converter 23 into digital values which are supplied to the minicomputer 24 and compared therein with separately entered set values, and, based on the results, the minicomputer 24 outputs control output signals to the pH regulating apparatus 13, the coolant flow rate regulating valve 22, the drive apparatus 11 and the exhaust flow rate regulating valve 15 thereby controlling the environmental conditions of pH, temperature, and dissolved oxygen concentration of the culture medium 25 and

pressure of the culture tank 10 at conditions preferable for the proliferation of the microorganisms.

In this manner, the pH of the culture medium 25 during the culture is constantly controlled to be the set value, and, the speed of variation in pH is proportional to the amount of addition of the pH regulating agent from the pH regulating apparatus 13 to the culture medium 25 which is required for controlling the pH of the culture medium 25 to be the set value. Therefore, the measurement of the amount of addition of the pH regulating agent is made by maintaining the pH regulating agent that is added by the opening action of the solenoid valve of the pH regulating apparatus 13, at a constant amount, and by multiplying the number of additions obtained by multiplying the frequency of such additions by the set period, with the above amount of the pH regulating amount added by the opening action of the solenoid valve of the pH regulating apparatus 13, and the minicomputer 24 executes a calculation according to the equation (1) based on the amount of addition of the pH regulating agent and outputs a control output signal to the variable flow rate pump 14, whereby the substrate can be supplied with the appropriate supply rate to the culture medium 25.

$$F = C \cdot N \cdot q \quad (1)$$

wherein:

F: substrate supply rate

N: number of additions obtained by multiplying a frequency of such additions by the set period

q: set amount of the pH regulating amount added in the opening action of the solenoid valve of the pH regulating apparatus 13.

In a high yield culture method for microorganisms, the excess or deficiency of the carbon source in the culture medium can be prevented by controlling the substrate supply rate to the culture medium, which is done by adjusting the amount of addition of the pH regulating agent to that required for maintaining the pH of the culture medium, this amount being proportional to the speed of variation of pH when the pH of the culture medium during the culture is controlled so as to maintain a set value.

As explained in the foregoing, the present invention is a high yield culture method for microorganisms metabolizing an acidic or alkaline substance as the microorganisms proliferate under environmental conditions controlled to be preferable for the proliferation of the microorganisms, by measuring the amount of addition of a pH regulating agent and controlling the substrate supply rate based on the amount of addition, and thus has the effect of preventing excess or deficiency of the carbon source in the culture medium and attaining a high yield of the microorganisms.

#### **Brief Description of the Drawing**

The drawing shows an embodiment of the present invention and is a system view of a high yield microorganism culture apparatus embodying the present invention.

- 10      culture tank
- 11      drive apparatus
- 12      agitating fins
- 13      pH regulating apparatus
- 14      variable flow rate pump

- 15 exhaust flow rate regulating valve**
- 16 pressure gauge**
- 17 pH electrode**
- 18 temperature measuring resistor**
- 19 dissolved oxygen concentration meter**
- 20 aerating pipe**
- 21 jacket**
- 22 coolant flow rate regulating valve**
- 23 A/D converter**
- 24 minicomputer**

**[drawing]**

**pH regulating agent**

**substrate**

**aeration**

**exhaust**

**coolant**

⑬ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—98085

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 1/00

識別記号

庁内整理番号  
6760—4 B

③ 公開 昭和58年(1983) 6 月10日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

④ 微生物の高収率培養法

② 特 願 昭56—194517  
② 出 願 昭56(1981)12月 4 日  
⑦ 発 明 者 松下伸生  
下松市大字東豊井794番地株式  
会社日立製作所笠戸工場内  
⑦ 発 明 者 西海正治  
下松市大字東豊井794番地株式  
会社日立製作所笠戸工場内  
⑦ 発 明 者 藤本正勝  
下松市大字東豊井794番地株式

会社日立製作所笠戸工場内  
⑦ 発 明 者 清水範夫  
日立市幸町 3 丁目 1 番 1 号株式  
会社日立製作所日立研究所内  
⑦ 発 明 者 上野正雄  
日立市幸町 3 丁目 1 番 1 号株式  
会社日立製作所日立研究所内  
⑦ 出 願 人 株式会社日立製作所  
東京都千代田区丸の内 1 丁目 5  
番 1 号  
⑦ 代 理 人 弁理士 薄田利幸

明 細 書

発明の名称 微生物の高収率培養法  
特許請求の範囲

1. 増殖に伴って酸あるいはアルカリ性物質を代謝する微生物を、環境条件を微生物の増殖に好ましい条件に制御しつつ培養する方法において、PH調整剤の添加量を測定し、該添加量に基づいて基質供給速度を制御することを特徴とする微生物の高収率培養法。
2. 前記 PH調整剤の添加量を、既知の一定量を逐次添加し、その添加頻度を一定期間積算した添加回数に既知の一定量を乗ずることにより測定する特許請求の範囲第 1 項記載の微生物の高収率培養法。

発明の詳細な説明

本発明は、微生物の高収率培養法に係り、特に、増殖に伴ない酸あるいはアルカリ性物質を代謝する微生物を高収率培養するのに好適な微生物の高収率培養法に関する。

従来、微生物の培養法としては、炭素源となる

基質の全量を培養開始前に供給する方法又は培養途中においても炭素源となる基質を供給する方法が慣用されている。

しかし、前者の微生物の培養法では、培養開始時に大量の炭素源が存在するため、炭素源により微生物の増殖が阻害されるという問題があり、又、後者の微生物の培養法では、炭素源の濃度を一定に保つことができるので長期間安定した培養を維持できるが、微生物による炭素源の消費速度の変化が大きいため、炭素源である基質の供給方法によっては次のような問題点があった。

- (1) 予め設定された一定量の基質を逐次又は連続的に供給する方法では、微生物による炭素源の消費速度の変化に基質の供給量が追従できない場合、炭素源に過不足が生じ微生物の増殖が阻害される。
- (2) 炭素源が有機酸である場合は、培地の PH を指標にして炭素源である基質を供給する方法があるが、この場合は、微生物による有機酸の消費に伴い培地の PH が上昇することが必要であ



り、炭素源が限定される。

- (3) 炭素源が中性である場合は、溶存酸素濃度を指標にして炭素源である基質を供給する方法があるが、現状の溶存酸素濃度計には、ドリフト、感度低下等の問題があり、正確な溶存酸素濃度値が得られないため、基質供給を精密に制御することができない。

本発明は、上記諸問題の解決を目的としたもので、PH調整剤の添加量を測定し、該添加量に基づいて炭素源である基質の供給速度を制御することができる微生物の高収率を達成することができる微生物の高収率培養法を提供するものである。

本発明の一実施例を図面により説明する。

図面は、本発明を実施した微生物の高収率培養装置の系統図で、培養槽10には、溶存酸素濃度調節装置、例えば、回転数可変装置が設けられた駆動装置11で回転駆動する攪拌翼12が回転可能に内設され、その上部には、例えば、アルカリあるいは酸の貯蔵タンクに電磁弁、調節弁を設けたPH

調節装置13と、基質供給速度調節装置、例えば、流量可変ポンプ14と、圧力調節装置、例えば、排気流量調節弁15と、圧力測定装置、例えば、圧力計16とがそれぞれ設置され、その中間部には、PH測定装置、例えば、PH電極17と、温度測定装置、例えば、温度抵抗体18と、溶存酸素濃度測定装置、例えば、溶存酸素濃度計19とがそれぞれ設置され、その下部には、通気用導管20が連結されている。又、培養槽10に周設されたジャケット21には、温度調節装置、例えば、冷却水流量調節弁22が設けられている。圧力計16と、PH電極17と、温度抵抗体18と、溶存酸素濃度計19とは、アナログ/デジタル変換装置、例えば、マルチプレクサ付で多点処理可能なA/D変換器23にそれぞれ接続され、又、駆動装置11と、PH調節装置13と、流量可変ポンプ14と、排気流量調節弁15と、冷却水流量調節弁22とは、A/D変換器23と接続された演算・制御・記憶・入出力装置、例えば、キーボード付のミニコン24にそれぞれ接続されている。

培養槽10に培地を張込み例えば、微生物が好

気性である場合は、通気用導管20より通気し培養が開始される。培養中は、PH電極17、温度抵抗体18、溶存酸素濃度計19及び圧力計16により、培地のPH、温度、溶存酸素濃度及び培養槽10の圧力を測定し、これらの測定値をA/D変換器23でそれぞれデジタル値に変換した後に、ミニコン24に入力され、ここで、別に入力されている各設定値と比較演算され、その結果によりミニコン24から制御出力信号を、PH調節装置13と、冷却水流量調節弁22と、駆動装置11と、排気流量調節弁15とにそれぞれ出力することにより、培地のPH、温度、溶存酸素濃度及び培養槽10の圧力の環境条件は、微生物の増殖に好ましい条件に制御される。

このように、培養中の培地のPHは、常時設定値になるように制御されるが、この時、PHの変化速度は、培地25のPHを設定値に制御するに要したPH調節装置13から培地へのPH調整剤の添加量に比例する。従って、PH調整剤の添加量を、例えば、PH調節装置13の電磁弁の1回

の開弁で添加されるPH調整剤を一定量とし、その添加頻度を一定期間積算した添加回数にPH調節装置13の電磁弁の1回の開弁で添加されるPH調整剤の一定量を受ずることにより測定し、この測定されたPH調整剤の添加量をもとに演算式(1)によりミニコン24で演算してミニコン24から流量可変ポンプ14に制御出力信号を出力することにより培地には、適正な供給速度にて基質が供給される。

$$F = O \cdot N \cdot q \quad (1)$$

ここで、F：基質供給速度

O：菌種によって定まる定数

N：PH調整剤の添加頻度を一定期間積算した添加回数

q：PH調節装置の電磁弁の1回の開弁で添加されるPH調整剤の一定量

このような、微生物の高収率培養法では、培養中の培地のPHが常時設定値になるように制御される際のPHの変化速度と比例関係にある培地の

PHを設定値とするに要したPH調整剤の添加量により、培地への基質供給速度を制御することで、培養中の炭素源の過不足を防止することができる。

本発明は、以上説明したように、増殖に伴って酸あるいはアルカリ性物質を代謝する微生物を、環境条件を微生物の増殖に好ましい条件に制御しつつ、PH調整剤の添加量を測定し、該添加量に基づいて基質供給速度を制御する微生物の高収率培養法であるので、培養中の炭素源の過不足を防止でき、微生物の高収率を達成できる効果がある。

#### 図面の簡単な説明

図面は、本発明の一実施例を説明するもので、本発明を実施した微生物の高収率培養装置の系統図である。

10 …… 培養槽、11 …… 駆動装置、12 …… 攪拌翼、13 …… PH調節装置、14 …… 流量可変ポンプ、15 …… 排気流量調節弁、16 …… 圧力計、17 …… PH電極、18 …… 潤滑抵抗体、19 …… 溶存酸素濃度計、20 …… 通気用導管、21 …… ジャケット、22 …… 冷却水流量調節弁、23 …… A/D変換器、24 …… ェ

